

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ :	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/49142
C12N 15/10, C12P 19/34		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. August 2000 (24.08.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/EP00/01356	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum:	18. Februar 2000 (18.02.00)	
(30) Prioritätsdaten:		Veröffentlicht
199 07 080.6	19. Februar 1999 (19.02.99)	Mit internationalem Recherchenbericht.
199 28 843.7	24. Juni 1999 (24.06.99)	Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.
199 40 752.5	27. August 1999 (27.08.99)	
PCT/EP99/06316	27. August 1999 (27.08.99)	
199 57 116.3	26. November 1999 (26.11.99)	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):	FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE]; Gässelweg 15, D-69469 Weinheim (DE).	
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):	STÄHLER, Peer, F. [DE/DE]; Riedfeldstrasse 3, D-68169 Mannheim (DE). STÄHLER, Cord, F. [DE/DE]; Siegfriedstrasse 9, D-69469 Weinheim (DE). MÜLLER, Manfred [DE/DE]; Mannheimerstrasse 11, D-69198 Schriesheim (DE).	
(74) Anwälte:	WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).	

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYMERS

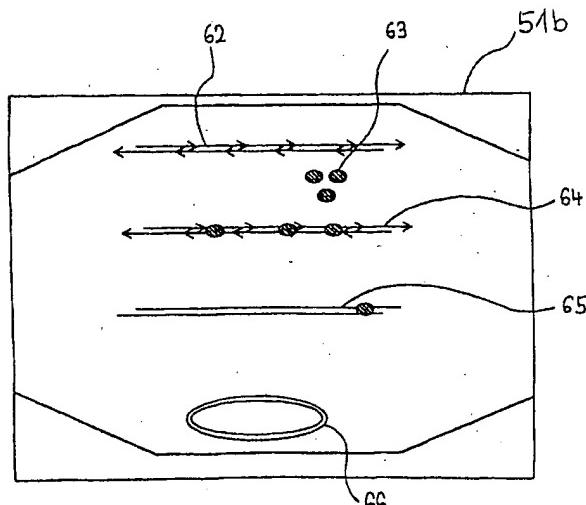
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON POLYMEREN

(57) Abstract

The invention relates to a method for producing polymers, especially synthetic nucleic acid double strands of optional sequence, comprising the following steps: (a) providing a support with a surface which contains a plurality of individual reaction zones, (b) location-resolved synthesis of nucleic acid fragments with different base sequences respectively in several of the individual reaction areas and (c) removing the nucleic acid fragments from the individual reaction areas.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Polymeren, insbesondere von synthetischen Nukleinsäuredoppelsträngen wahlfreier Sequenz, umfassend die Schritte: (a) Bereitstellen eines Trägers mit einer Oberfläche, die eine Vielzahl von individuellen Reaktionsbereichen enthält; (b) ortsaufgelöstes Synthetisieren von Nukleinsäurefragmenten mit jeweils unterschiedlicher Basensequenz an mehreren der individuellen Reaktionsbereiche; und (c) Ablösen der Nukleinsäurefragmente von individuellen Reaktionsbereichen.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	MJ	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	IU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

- 1 -

Verfahren zur Herstellung von Polymeren

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Polymeren, insbesondere von synthetischen Nukleinsäuredoppelsträngen wahlfreier Sequenz.

10 Technischer Hintergrund der Erfindung

Die Manipulation und Konstruktion von genetischen Elementen, wie z.B. Genfragmenten, ganzen Genen oder regulatorischen Bereichen, durch die Entwicklung der DNA-Rekombinationstechnik, welche häufig auch als Gentechnik bezeichnet wird, führte zu einem besonderen Bedarf an gentechnischen Methoden und deren Weiterentwicklung in den Bereichen der Gentherapie, molekularen Medizin (Grundlagenforschung, Vektorentwicklung, Vakzine, Regeneration etc.). Wichtige Anwendungsgebiete sind auch die Wirkstoff-Entwicklung, Wirkstoff-Produktion im Rahmen der Pharmaka-Entwicklung, 15 kombinatorische Biosynthese (Antikörper, Effektoren wie Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter etc.), Biotechnologie (z.B. Enzymdesign, Pharming, biologische Herstellungsverfahren, Bioreaktoren etc.), Diagnostika (BioChips, Rezeptoren / Antikörper, Enzymdesign etc.) und Umwelttechnik (spezialisierte oder maßgeschneiderte Mikroorganismen, 20 Produktionsverfahren, Sanierung, Sensoren etc.).

25

Stand der Technik

Zahlreiche Methoden, allen voran die enzymgestützten Verfahren, erlauben die gezielte Manipulation von DNA für unterschiedliche Zwecke.

30

Diese Verfahren müssen allesamt auf vorhandenes genetisches Material zurückgreifen. Dieses ist zwar einerseits weitgehend definiert, erlaubt aber

- 2 -

andererseits in einer Art "Baukastensystem" nur eine beschränkte Menge möglicher Kombinationen der jeweiligen vorhandenen und leicht modifizierten Elemente.

- 5 Vollsynthetische DNA spielt dabei bisher nur eine untergeordnete Rolle in Form eines dieser kombinatorischen Elemente, mit deren Hilfe gezielte Veränderungen des zur Verfügung stehenden genetischen Materials möglich sind.
- 10 Den bekannten Verfahren gemeinsam ist der hohe Arbeitsaufwand, verbunden mit einer gewissen Dauer entsprechender Arbeiten, da die Stufen molekularbiologischer und insbesondere gentechnischer Experimente, wie der Isolierung von DNA, Manipulation, Transfer in geeignete Zielzellen, Vermehrung, erneute Isolation etc., zumeist mehrfach durchlaufen werden müssen. Viele der anfallenden Arbeitsschritte lassen sich nur ungenügend automatisieren und beschleunigen, so daß die entsprechenden Arbeiten zeitaufwendig und arbeitsintensiv bleiben. Bei der Isolation von Genen, die einer funktionellen Untersuchung und einer Charakterisierung des Genproduktes vorausgehen muß, läuft der Informationsfluß in den meisten 15 Fällen von isolierter RNA (mRNA) über cDNA und entsprechende Genbibliotheken über aufwendige Screening-Verfahren zu einem einzelnen Klon. Dieser enthält die gesuchte und in ihm klonierte DNA häufig unvollständig, so daß sich weitere Screening-Verfahren etc. anschließen.
- 20 Schließlich ist die oben beschriebene Rekombination von DNA-Fragmenten nur begrenzt flexibel und erlaubt gemeinsam mit dem beschriebenen Arbeitsaufwand nur wenige Optimierungsschleifen. Gerade solche Optimierungen sind angesichts der Vielfalt und Komplexität in der Genetik, der funktionellen Genomik und der Proteomik, also dem Studium der 25 Wirkungen der Genprodukte, ein Nadelöhr für die weitere Entwicklung der modernen Biologie.

- 3 -

Ein gängiges Verfahren ist die Rekombination durch enzymatische Methoden (in vitro): Hierbei werden DNA-Elemente (isolierte genomische DNA, Plasmide, Amplicons, virale oder bakterielle Genome, Vektoren) zunächst mit entsprechenden Restriktionsenzymen zu Fragmenten mit definierten Enden zerschnitten. Je nach Beschaffenheit dieser Enden können die entstandenen Fragmente neu kombiniert und (ebenfalls enzymatisch) zu größeren DNA-Elementen verbunden werden. Zum Zwecke der Vermehrung der DNA erfolgt dies häufig in einem als Klonierungs-Vektor funktionierenden Plasmid.

10

Die rekombinierte DNA muss in aller Regel in geeigneten Organismen klonal vermehrt werden (Klonierung) und steht nach diesem zeitaufwendigen Schritt und der Isolierung durch entsprechende Methoden erneut für Manipulationen, wie z.B. Rekombination, zur Verfügung. Limitierend sind bei dieser Methode aber die Schnittstellen der Restriktionsenzyme: Jedes Enzym erkennt auf der (doppelsträngigen) DNA eine spezifische Sequenz, wobei deren Länge in Abhängigkeit vom jeweiligen Enzym zwischen drei und zwölf Nukleotid-Basen beträgt und sich demnach auf jedem DNA-Element nach einer statistischen Verteilung eine bestimmte Anzahl von Schnittstellen befindet, an denen der DNA-Strang durchtrennt wird. Wichtig für die Rekombination ist dabei die Zerlegung der bearbeiteten DNA in definierte Fragmente, die sich anschließend zu der gewünschten Sequenz zusammensetzen lassen. Bis zu einem Grenzbereich der zu schneidenden DNA von 10 - 30 Kilobasenpaaren (kbp) stehen der Rekombinationstechnik ausreichend unterschiedliche und spezifische Enzyme zur Verfügung. Durch Vorarbeiten und kommerzielle Anbieter gibt es außerdem die entsprechenden Vektoren, die die rekombinierte DNA aufnehmen und eine Klonierung (und damit Vermehrung und Selektion) erlauben. Solche Vektoren enthalten angepaßte Schnittstellen für effiziente Rekombination und Integration.

- 4 -

Aus den Regeln der Statistik erwächst aber mit zunehmender Länge der manipulierten DNA das Problem mehrfacher und unerwünschter Schnittstellen. Bei einer Enzym-Erkennungssequenz von 6 Nukleotid-Basen gibt es im statistischen Mittel pro 4000 Basen-Paaren eine Schnittstelle (4^6)
5 und bei 8 Nukleotid-Basen pro 65.000 (4^8). Für die Manipulation größerer DNA-Elemente (z.B. virale Genome, Chromosomen etc.) ist die Rekombination mit Restriktionsenzymen daher wenig geeignet.

Bekannt ist außerdem eine Rekombination durch homologe Rekombination
10 in Zellen: Hierbei können größere DNA-Elemente bei Vorliegen von Abschnitten gleicher Sequenz auf den zu rekombinierenden Elementen über den natürlichen Vorgang der homologen Rekombination neu zusammengestellt und manipuliert werden. Diese Rekombinationsereignisse sind wesentlich indirekter als bei der Restriktionsenzym-Methodik und
15 darüber hinaus schwieriger zu steuern. Sie liefern oft deutlich schlechtere Ausbeuten als die oben beschriebene Rekombination mit Restriktionsenzymen.

Ein zweiter wesentlicher Nachteil ist die Beschränkung auf die erwähnten
20 Abschnitte gleicher Sequenz, die damit einerseits überhaupt erst vorliegen müssen und andererseits sehr spezifisch für das jeweilige System sind. Die gezielte Einführung entsprechender Sequenzen bereitet dann ihrerseits erhebliche Schwierigkeiten.

25 Darüber hinaus bekannt ist die Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction: PCR), die eine enzymatische Synthese von DNA (inklusive starker Vervielfältigung) erlaubt, indem die begrenzenden Regionen des zu vervielfältigenden Abschnittes durch kurze, vollsynthetische DNA-Oligomere (sog. Primer) den Start einer DNA-Replikation vorgeben. Dafür müssen diese
30 flankierenden Bereiche allerdings bekannt und für die dazwischenliegende Region spezifisch sein. Die Polymerasen bauen bei Replikation des Stranges allerdings in einer vom jeweiligen Enzym abhängigen Häufigkeit auch falsche

- 5 -

- Nukleotide ein, so daß stets die Gefahr einer gewissen Verfälschung der Ausgangssequenz besteht. Bei manchen Anwendungen ist diese schleichende Verfälschung sehr störend. In die Primer können bei der chemischen Synthese Sequenzen, wie z.B. die oben beschriebenen Restriktions-Schnittstellen, eingefügt werden. Dies erlaubt eine (begrenzte) Manipulation der gesamten Sequenz. Der vervielfältigte Bereich kann mittlerweile bis in den Bereich von ca. 30 Kbp gehen, allerdings ist der größte Teil dieses DNA-Moleküles die Kopie einer vorher vorhandenen DNA.
- 10 Die Primer werden mit automatisierter Festphasen-Synthese hergestellt und sind breit verfügbar, allerdings bedingt die Konfiguration aller bisherigen Synthese-Automaten die Herstellung von zu großen Mengen an Primer-DNA (μ mol-Ansätze), wie sie für die PCR nicht notwendig sind, während die Variantenvielfalt beschränkt bleibt.
- 15
- Synthetische DNA-Elemente
- Seit den Pionierarbeiten von Khorana (u.a. in: Shabarova: Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, VCH Weinheim;) in den 60er Jahren wurden wiederholt Ansätze beschrieben, um aus chemisch synthetisierten DNA-Molekülen doppelsträngige DNA mit genetischen bzw. kodierenden Sequenzen zusammenzusetzen. Stand der Technik sind hierbei genetische Elemente einer Länge bis ca. 2 kbp, die aus Nukleinsäuren aufgebaut werden. Die chemische Festphasensynthese von Nukleinsäuren und Peptiden ist automatisiert worden. Entsprechende Verfahren und Geräte sind z.B. in der US 4353989 und der US 5112575 beschrieben.
- 20
- Der Aufbau von doppelsträngiger DNA aus kurzen Oligonukleotiden geschieht nach zwei Verfahren (siehe Holowachuk et. al., PCR Methods and Applications, Cold Spring Harbor Laboratory Press): Einmal erfolgt die Synthese des gesamten Doppelstranges durch Synthese von einzelsträngigen Nukleinsäuren (geeigneter Sequenz), Aneinanderlagerung durch Hybridisieren komplementärer Bereiche und Verbinden des
- 25

- 6 -

molekularen Rückrates durch z.B. Ligase. Demgegenüber gibt es auch die Möglichkeit einer Synthese von an den Rändern überlappenden Bereichen als einzelsträngige Nukleinsäuren, Aneinanderlagerung durch Hybridisieren, Auffüllen der einzelsträngigen Bereiche durch Enzyme (Polymerasen) und 5 Verbinden des Rückgrates.

Bei beiden Methoden ist die Gesamtlänge des genetischen Elementes durch den Aufwand und die Herstellungskosten für Nukleinsäuren in makroskopischer Säulen-Synthese einerseits und durch die Logistik von 10 getrennt in makroskopischer Säulen-Synthese hergestellten und dann zusammengeführten Nukleinsäuren andererseits auf nur wenige tausend Nukleotid-Basen beschränkt. Damit wird der gleiche Größenbereich abgedeckt wie mit der DNA-Rekombinationstechnik.

15 Zusammenfassend kann der Stand der Technik als eine Vorgehensweise beschrieben werden, bei der in Analogie zu logischen Operationen das Vorhandene (in diesem Fall genetisches Material in Form von Nukleinsäuren) untersucht und kombiniert wird (Rekombination). Das Ergebnis solcher Rekombinations-Experimente wird dann untersucht und erlaubt 20 Rückschlüsse, u.a. auf die eingesetzten Elemente und ihre kombinierte Wirkung. Die Vorgehensweise kann daher als (punktuell-)analytisch und kombinatorisch beschrieben werden.

Der Stand der Technik erlaubt somit keine systematischen Untersuchungen 25 aller beliebigen Kombinationen. Die Veränderung der kombinierten Elemente ist fast nicht möglich. Das systematische Austesten von Veränderungen ist nicht möglich.

Gegenstand der Erfindung und damit gelöste Aufgabe

30 Bereitgestellt werden soll ein Verfahren zur direkten Umsetzung von digitaler genetischer Information (Zielsequenz, Datenbanken etc.) in biochemische

- 7 -

genetische Information (Nukleinsäuren), ohne auf die Verwendung von bereits vorhandenen Nukleinsäurefragmenten zurückzugreifen.

- Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung von Polymeren, wobei eine Vielzahl von Oligomerbaublöcken auf einem Träger durch parallele Syntheseschritte aufgebaut, vom Träger abgelöst und untereinander zum Aufbau des Polymeren in Kontakt gebracht werden. Vorzugsweise werden doppelsträngige Nukleinsäure-Polymerne mit einer Länge von mindestens 300 bp, insbesondere mindestens 1 000 bp synthetisiert. Die Nukleinsäure-Polymerne sind vorzugsweise ausgewählt aus Genen, Genclustern, Chromosomen, viralen und bakteriellen Genomen oder Abschnitten davon. Die zum Aufbau des Polymeren verwendeten Oligomerbaublöcke haben eine Länge von vorzugsweise 5-150, besonders bevorzugt 5-30 Monomereinheiten. In aufeinander folgenden Schritten können jeweils partiell komplementäre Oligonukleotidbaublöcke vom Träger abgelöst werden und unter Hybridisierungsbedingungen miteinander bzw. mit dem Polymer-Zwischenprodukt in Kontakt gebracht werden. Weitere Beispiele für geeignete Polymerne sind Nukleinsäureanaloga und Proteine.
- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von synthetischer DNA mit beliebig wählbarer Sequenz und damit beliebigen bekannten oder neuen funktionellen genetischen Elementen, die in dieser Sequenz enthalten sind. Dieses Verfahren umfaßt die Schritte
- (a) Bereitstellen eines Trägers mit einer Oberfläche, die eine Vielzahl von individuellen Reaktionsbereichen enthält,
 - (b) ortsaufgelöstes Synthetisieren von Nukleinsäurefragmenten mit jeweils unterschiedlicher Basensequenz an mehreren der individuellen Reaktionsbereiche, und
 - (c) Ablösen der Nukleinsäurefragmente von individuellen Reaktionsbereichen.

- 8 -

Vorzugsweise werden die Basensequenzen der an individuellen Reaktionsbereichen synthetisierten Nukleinsäurefragmente so gewählt, daß sie sich zu einem Nukleinsäuredoppelstrang-Hybrid zusammenlagern können. Das Ablösen der Nukleinsäurefragmente in Schritt (c) kann dann in 5 einem oder mehreren Schritten unter solchen Bedingungen erfolgen, daß sich mehrere, d.h. zumindest einige der abgelösten Nukleinsäurefragmente zu einem Nukleinsäuredoppelstrang-Hybrid zusammenlagern. Anschließend können die einen Strang des Nukleinsäuredoppelstrang-Hybrids bildenden Nukleinsäurefragmente zumindest teilweise kovalent miteinander verbunden 10 werden. Dies kann durch enzymatische Behandlung, z.B. mit Ligase, oder/und Auffüllen von Lücken in den Strängen mit DNA-Polymerase erfolgen.

Das Verfahren beinhaltet im Rahmen eines modularen Systems die Synthese 15 sehr vieler einzelner Nukleinsäurestränge, die als Bausteine dienen, wodurch in einem z.B. mikrofluidischen Reaktionsträger eine doppelsträngige Nukleinsäure-Sequenz erzeugt wird, die über 100.000 Basenpaare lang sein kann.

20 Die verfahrensgemäße Herstellung der hochkomplexen synthetischen Nukleinsäure, die vorzugsweise aus DNA besteht, erfolgt nach folgendem Prinzip: Zunächst werden relativ kurze DNA-Stränge durch *in situ* Synthese in einer Vielzahl von Reaktionsbereichen auf einem Reaktionsträger synthetisiert. Dies kann beispielsweise mit den in den Patentanmeldungen 25 DE 199 24 327.1, DE 199 40 749.5, PCT/EP99/06316 und PCT/EP99/06317 beschriebenen Trägern geschehen. Dabei ist jeder Reaktionsbereich für die individuelle und spezifische Synthese einer einzelnen vorgegebenen DNA-Sequenz von c.a. 10 - 100 Nukleotiden Länge geeignet. Diese DNA-Stränge bilden die Bausteine für den gezielten Aufbau 30 sehr langer DNA-Moleküle. Dabei kann der verwendete fluidische Mikroprozessor speziell für die Anwendung gestaltete Reaktionsräume tragen.

- 9 -

- Die DNA-Synthese selbst erfolgt somit in Anlehnung an die automatisierte Festphasensynthese, jedoch mit einigen neuheitlichen Aspekten: Die "Festphase" ist in diesem Fall ein individueller Reaktionsbereich auf der Oberfläche des Trägers, z.B. die Wand des Reaktionsraums, also nicht in den Reaktionsraum eingebrachte Partikel, wie dies in einem konventionellen Synthesizer der Fall ist. Durch Integration der Synthese in einem mikrofluidischen Reaktionsträger (z.B. eine Struktur mit gegebenenfalls verzweigten Kanälen und Reaktionsräumen) können die Reagenzien und andere Komponenten, wie Enzyme, zugeführt werden.
- Nach der Synthese folgt ein Ablösen der synthetisierten Bausteine von diesen Reaktionsbereichen. Dieser Ablöseprozeß kann orts- oder/und zeitspezifisch für einzelne, mehrere oder alle DNA-Stränge durchgeführt werden.
- Für eine bevorzugte Verfahrensvariante ist es vorgesehen, mehrere Reaktionsbereiche innerhalb eines fluidischen Raumes bzw. Kompartements zu realisieren und zu nutzen, so daß die dort synthetisierten DNA-Stränge in einem Arbeitsschritt abgelöst und aus dem Kompartement, das die Reaktionsbereiche fluidisch verbindet, abgeführt werden können.
- Danach werden geeignete Kombinationen der abgelösten DNA-Stränge gebildet. Die Zusammenlagerung von einzelsträngigen oder/und doppelsträngigen Bausteinen erfolgt dann beispielsweise innerhalb eines Reaktionsraumes, der einen oder mehrere Reaktionsbereiche für die Synthese beinhalten kann. Die Sequenz der einzelnen Bausteine wird dabei zweckmäßigerweise so gewählt, daß beim Inkontaktbringen der einzelnen Bausteine zueinander komplementäre Bereiche an den beiden zusammengebrachten Enden zur Verfügung stehen, um durch Hybridisierung dieser Bereiche eine spezifische Aneinanderlagerung von weiteren DNA-Strängen zu ermöglichen. Damit entstehen längere DNA-Hybride. Das Phosphordiester-Rückgrat dieser DNA-Hybride kann kovalent, z.B. durch

- 10 -

Ligasen, geschlossen und eventuelle Lücken im Doppelstrang in bekannter Vorgehensweise enzymatisch mittels Polymerasen aufgefüllt werden. Eventuell vorhandene einzelsträngige Bereiche können durch Enzyme (z.B. Klenow-Fragment) unter Zugabe von geeigneten Nukleotiden aufgefüllt werden. So entstehen längere DNA-Moleküle. Durch die Zusammenführung von Clustern an derart synthetisierten DNA-Strängen innerhalb von Reaktionsräumen können wiederum längere Teilsequenzen des finalen DNA-Moleküles erzeugt werden. Dies kann stufenweise geschehen, und die Teilsequenzen werden dabei zu immer längeren DNA-Molekülen zusammengesetzt. Auf diese Weise lassen sich sehr lange DNA-Sequenzen als vollsynthetisches Molekül mit einer Länge von über 100.000 Basenpaaren erzeugen.

Die Menge an individuellen Bausteinen, die für ein langes synthetisches DNA-Molekül notwendig ist, wird in dem Reaktionsträger durch parallele Synthese der Bausteine in einem orts- oder/und zeitaufgelösten Synthese-Verfahren bewältigt. Diese parallele Synthese erfolgt in der bevorzugten Ausführungsform durch lichtabhängige orts- oder/und zeitaufgelöste DNA-Synthese in einem fluidischen Mikroprozessor, wie er auch in den Patentanmeldungen DE 199 24 327.1, DE 199 40 749.5, PCT/EP99/06316 und PCT/EP99/06317 beschrieben ist.

Der miniaturisierte Reaktionsträger bewirkt dabei eine Reduktion der Menge an Einsatzstoffen um mindestens einen Faktor 1.000 im Vergleich zu einem konventionellen DNA-Synthesizer. Gleichzeitig wird eine extreme Vielzahl an Nukleinsäuredoppelsträngen definierter Sequenz hergestellt. Nur so kann die Erzeugung einer sehr großen Vielfalt an individuellen Bausteinen, wie sie für die Synthese langer DNA-Moleküle Voraussetzung ist, unter Einsatz einer ökonomisch sinnvollen Menge an Ressourcen erfolgen. Für den Aufbau einer Sequenz von 100.000 Basenpaaren aus überlappenden Bausteinen von 20 Nukleotiden Länge werden 10.000 individuelle Bausteine benötigt. Dies

- 11 -

kann mit entsprechend miniaturisierten Geräten in einem hochparallelen Synthese-Verfahren geleistet werden.

Für die rationelle Bearbeitung genetischer Moleküle und die systematische
5 Erfassung aller möglichen Varianten müssen die Bausteine in ihrer individuellen Sequenz flexibel und ökonomisch hergestellt werden. Dies leistet das Verfahren vorzugsweise durch den Einsatz einer programmierbaren Lichtquellenmatrix für die lichtabhängige orts- oder/und zeitaufgelöste *in situ* Synthese der DNA-Stränge, die wiederum als
10 Bausteine für den Aufbau längerer DNA-Stränge Verwendung finden können. Diese flexible Synthese erlaubt die freie Programmierung der individuellen Sequenzen der Bausteine und damit auch die Erzeugung von beliebigen Varianten der Teilsequenzen oder der finalen Sequenz, ohne daß damit wesentliche Veränderungen von Komponenten des Systems
15 (Hardware) verbunden wären. Durch diese programmierte Synthese der Bausteine und damit der finalen Syntheseprodukte kann die Vielfalt genetischer Elemente systematisch bearbeitet werden. Gleichzeitig erlaubt die Verwendung der computergesteuert programmierbaren Synthese die Automatisierung des gesamten Prozesses inklusive der Kommunikation mit
20 entsprechenden Datenbanken.

Die Auswahl der Sequenz der einzelnen Bausteine kann bei Vorgabe der Zielsequenz rationell unter Berücksichtigung von biochemischen und funktionellen Parametern erfolgen. Dabei sucht ein Algorithmus nach
25 Eingabe der Zielsequenz (z.B. aus einer Datenbank) die geeigneten Überlappungsbereiche heraus. Je nach der Aufgabenstellung können unterschiedlich viele Teilsequenzen erstellt werden, und zwar innerhalb eines Reaktionsträgers oder auf mehrere Reaktionsträger verteilt. Die Anlagerungsbedingungen für die Bildung der Hybride, wie z.B. Temperatur,
30 Salzkonzentration etc., werden durch einen entsprechenden Algorithmus auf die zur Verfügung stehenden Überlappungsbereiche abgestimmt. So wird eine maximale Spezifität der Aneinanderlagerung gewährleistet. Die Daten

- 12 -

für die Zielsequenz können in einer vollautomatischen Version auch direkt aus öffentlichen oder privaten Datenbanken entnommen und in entsprechende Zielsequenzen umgewandelt werden. Die entstehenden Produkte können wiederum optional in entsprechend automatisierte Abläufe eingespeist werden, z.B. in die Klonierung in geeigneten Zielzellen.

Der stufenweise Aufbau durch Synthese der einzelnen DNA-Stränge in Reaktionsbereichen innerhalb umgrenzter Reaktionsräume erlaubt auch den Aufbau schwieriger Sequenzen, z.B. solche mit internen Wiederholungen von Sequenzabschnitten, wie sie z.B. bei Retroviren und entsprechenden retroviralen Vektoren vorkommen. Durch die gesteuerte Ablösung von Bausteinen innerhalb der fluidischen Reaktionsräume kann eine Synthese beliebiger Sequenz erfolgen, ohne daß Probleme durch die Zuordnung der überlappenden Bereiche auf den einzelnen Bausteinen entstehen.

Die hohen Qualitätsanforderungen, die beim Aufbau sehr langer DNA-Moleküle notwendig sind, können u.a. durch die Verwendung einer Echtzeit-Qualitätskontrolle erfüllt werden. Dabei wird die ortsaufgelöste Synthese der Bausteine überwacht, ebenso die Ablösung und die Zusammenlagerung bis hin zur Erstellung der finalen Sequenz. Dann laufen alle Prozesse in einem lichtdurchlässigen Reaktionsträger ab. Des Weiteren wird die Möglichkeit geschaffen, im Durchlicht Reaktionen und fluidische Vorgänge durch z.B. eine CCD-Detektion zu verfolgen.

Der miniaturisierte Reaktionsträger wird vorzugsweise so ausgeführt, daß ein Ablösevorgang in den einzelnen Reaktionsräumen möglich ist, und somit die auf den innerhalb dieser Reaktionsräume liegenden Reaktionsbereichen synthetisierten DNA-Stränge einzeln oder in Clustern abgelöst werden. Bei geeigneter Ausführung des Reaktionsträgers ist die Zusammenlagerung der Bausteine in einem stufenweisen Prozeß in Reaktionsräumen möglich, außerdem die Entnahme von Bausteinen, Teilsequenzen oder des finalen Produktes, oder auch die Sortierung bzw. Auf trennung der Moleküle.

- 13 -

Die Zielsequenz kann nach ihrer Fertigstellung als integriertes genetisches Element durch Transfer in Zellen eingebracht und dadurch kloniert und im Zuge funktioneller Studien untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit ist es, das Syntheseprodukt zuerst weiter aufzureinigen oder zu analysieren,
5 wobei diese Analyse z.B. eine Sequenzierung sein kann. Der Prozeß der Sequenzierung kann auch durch direkte Kopplung mit einem entsprechenden Gerät beginnen, z.B. mit einer nach dem in den Patentanmeldungen DE 199 24 327.1, DE 199 40 749.5, PCT/EP99/06316 und PCT/EP99/06317 beschriebenen Vorrichtung zur integrierten Synthese und Analyse von
10 Polymeren. Es ist ebenfalls denkbar, die erzeugten Zielsequenzen nach der Klonierung zu isolieren und zu analysieren.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt über die damit erzeugten integrierten genetischen Elemente ein Werkzeug zur Verfügung, das für die Weiterentwicklung der molekularen Biologie die biologische Vielfalt in einem systematischen Prozeß erfaßt. Die Erzeugung von DNA-Molekülen mit gewünschter genetischer Information ist damit nicht mehr der Engpaß molekularbiologischer Arbeiten, da von kleinen Plasmiden über komplexe Vektoren bis zu Mini-Chromosomen alle Moleküle synthetisch erzeugt
20 werden können und für weitere Arbeiten zur Verfügung stehen.

Das Herstellungsverfahren erlaubt die Erzeugung von zahlreichen verschiedenen Nukleinsäuren und damit einen systematischen Ansatz für Fragestellungen betreffend Regulationselemente, DNA-Bindestellen für Regulatoren, Signalkaskaden, Rezeptoren, Wirkung und Interaktionen von Wachstumsfaktoren etc.

Durch die Integration von genetischen Elementen in eine vollsynthetische Gesamt-Nukleinsäure können die bekannten genetischen Werkzeuge wie Plasmide und Vektoren weiter genutzt und es kann so auf die entsprechenden Erfahrungen aufgebaut werden. Andererseits werden sich
30 diese Erfahrungen durch die angestrebte Optimierung der vorhandenen

- 14 -

Vektoren etc. rasch verändern. Die Mechanismen, die z.B. ein Plasmid für die Propagation in einem bestimmten Zelltyp geeignet machen, lassen sich auf der Grundlage des erfindungsgemäßen Verfahrens erstmals rationell untersuchen.

5

Durch diese rationelle Untersuchung großer Varianten-Zahlen lässt sich der gesamte Kombinationsraum genetischer Elemente erschließen. Damit wird neben die zur Zeit in rascher Entwicklung befindliche hochparallele Analytik (u.a. auf DNA-Arrays oder DNA-Chips) als zweites wichtiges Element die 10 programmierte Synthese integrierter genetischer Elemente geschaffen. Nur beide Elemente zusammen können das Fundament einer rationellen molekularen Biologie bilden.

Bei der programmierten Synthese von entsprechenden DNA-Molekülen ist 15 nicht nur die beliebige Zusammensetzung der codierenden Sequenzen und funktionellen Elemente möglich, sondern auch die Anpassung der Zwischenbereiche. Dies kann rasch zu Minimal-Vektoren und Minimal-Genomen führen, womit wiederum Vorteile durch deren geringere Größe entstehen. Übertragungsvehikel wie z.B. virale Vektoren können 20 dadurch effizienter gemacht werden, z.B. bei Verwendung von retroviralen oder adenoviralen Vektoren.

Über die Kombination bekannter genetischer Sequenzen hinaus ist die Entwicklung neuer genetischer Elemente möglich, die auf der Funktion 25 vorhandener Elemente aufbauen können. Gerade für solche Entwicklungsarbeiten ist die Flexibilität des Systems von enormem Wert.

Die synthetischen DNA-Moleküle sind dabei auf jeder Stufe der Entwicklung des hier beschriebenen Verfahrens voll kompatibel mit der vorhandenen 30 Rekombinationstechnologie. Auch für "traditionelle" molekularbiologische Anwendungen können integrierte genetische Elemente bereitgestellt werden, z.B. durch entsprechende Vektoren. Der Einbau entsprechender

- 15 -

Schnittstellen auch für bisher wenig verwendete Enzyme ist bei integrierten genetischen Elementen kein limitierender Faktor.

Verbesserungen gegenüber dem Stand der Technik

5 Ermöglicht wird mit diesem Verfahren die Integration aller gewünschten funktionellen Elemente als "genetische Module", wie z.B. Gene, Teile von Genen, Regulationselementen, virale Verpackungssignale etc., in das synthetisierte Nukleinsäuremolekül als Träger genetischer Information. Durch diese Integration ergeben sich u.a. folgende Vorteile:

10

Es können damit hochgradig funktionsintegrierte DNA-Moleküle entwickelt werden, wobei unnötige DNA-Bereiche wegfallen (Minimal-Gene, Minimal-Genome).

15

Die freie Kombination der genetischen Elemente sowie die Veränderungen der Sequenz wie z.B. zur Anpassung an den exprimierenden Organismus bzw. Zelltyp (Codon-Nutzung) werden ebenso ermöglicht wie Veränderungen der Sequenz zur Optimierung funktioneller genetischer Parameter, wie beispielsweise Genregulation.

20

Ebenfalls ermöglicht werden Veränderungen der Sequenz zur Optimierung funktioneller Parameter des Transkriptes, z.B. Spleissen, Regulation auf mRNA-Ebene, Regulation auf Translationsebene, und darüber hinaus die Optimierung funktioneller Parameter des Genprodukts, wie z.B. die Aminosäuresequenz (z.B. Antikörper, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Kanäle, Poren, Transporter etc.).

25

Insgesamt ist das mit dem Verfahren realisierte System extrem flexibel und erlaubt in bisher nicht vorhandener Weise die programmierte Erstellung von 30 genetischem Material mit stark verringertem Aufwand an Zeit, Materialien und Arbeit.

- 16 -

Größere DNA-Moleküle, wie z.B. Chromosomen, von mehreren Hundert kbp waren mit den vorhandenen Methoden nahezu nicht gezielt manipulierbar. Bereits komplexere (d.h. größere) virale Genome von mehr als 30 kbp (z.B. Adenoviren) sind mit den klassischen Methoden der Gentechnik schwierig 5 zu handhaben und zu manipulieren.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren kommt es zu einer erheblichen Verkürzung bis zur letzten Stufe der Klonierung eines Gens: Das Gen oder die Gene werden als DNA-Molekül synthetisiert und dann (nach geeigneter 10 Vorbereitung wie Reinigung etc.) direkt in Ziel-Zellen eingebracht und das Ergebnis studiert. Der mehrstufige, meist über Mikroorganismen wie E.coli laufende Klonierungsprozeß (z.B. DNA-Isolation, Reinigung, Analyse, Rekombination, Klonierung in Bakterien, Isolation, Analyse etc.) wird damit auf die letzte Übertragung des DNA-Moleküls in die finalen Effektorzellen 15 reduziert. Bei synthetisch hergestellten Genen oder Genfragmenten ist eine klonale Vermehrung in einem Zwischenwirt (zumeist E. coli) nicht mehr notwendig. Damit umgeht man die Gefahr, daß das für die Zielzelle bestimmte Genprodukt eine toxische Wirkung auf den Zwischenwirt ausübt. Damit hebt man sich deutlich ab von der Toxizität mancher Genprodukte, 20 die bei der Verwendung klassischer Plasmid-Vektoren häufig zu erheblichen Problemen bei der Klonierung der entsprechenden Nukleinsäure-Fragmente führt.

Eine weitere erhebliche Verbesserung ist die Zeitverkürzung und die 25 Reduktion der Arbeitsschritte bis nach dem Sequenzieren von genetischem Material, wobei vorgefundene potentielle Gene als solche verifiziert und kloniert werden. Normalerweise werden nach Auffinden interessierender Muster, die als offener Leserahmen (ORF) in Frage kommen, mit Sonden (z.B. mittels PCR) in cDNA-Bibliotheken entsprechende Klone gesucht, die 30 allerdings nicht die ganze Sequenz der ursprünglich bei ihrer Herstellung verwendeten mRNA enthalten müssen. Bei anderen Verfahren wird mittels eines Antikörpers in einer Expressions-Genbibliothek gesucht (Screening).

- 17 -

Beide Verfahren lassen sich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren extrem abkürzen: Bei Vorliegen einer "in silico" bestimmten Gen-Sequenz (d.h. nach der Erkennung eines entsprechenden Musters in einer DNA-Sequenz durch den Computer) oder nach Entschlüsselung einer Proteinsequenz kann ein 5 entsprechender Vektor mit der Sequenz oder Varianten davon direkt über programmierte Synthese eines integrierten genetischen Elementes erzeugt und in geeignete Zielzellen eingebracht werden.

Die so erfolgende Synthese von DNA-Molekülen bis zu mehreren 100 kbp 10 erlaubt die direkte Komplett-Synthese von viralen Genomen, z.B. Adenoviren. Diese sind ein wichtiges Werkzeug in Grundlagenforschung (u.a. Gentherapie), aber wegen der Größe ihres Genoms (ca. 40 kbp) schwer mit klassischen Methoden der Gentechnik zu handhaben. Besonders die rasche und ökonomische Erzeugung von Varianten zur 15 Optimierung ist dadurch stark limitiert. Diese Limitierung wird durch das erfindungsgemäße Verfahren aufgehoben.

Durch das Verfahren erfolgen die Integration der Synthese, die Ablösung der Syntheseprodukte und die Zusammenlagerung zu einem DNA-Molekül in 20 einem System. Mit Herstellungsverfahren der Mikrosystemtechnik können alle notwendigen Funktionen und Verfahrensschritte bis zur Aufreinigung des finalen Produktes in einem miniaturisierten Reaktionsträger integriert werden. Dies können Synthesebereiche, Ablösungsbereiche (Cluster), Reaktionsräume, Zuführungskanäle, Ventile, Pumpen, Konzentratoren, 25 Auftrennungsbereiche etc. sein.

Plasmide und Expressionsvektoren können für sequenzierte Proteine oder 30 entsprechende Teilsequenzen direkt hergestellt und die Produkte biochemisch und funktionell analysiert werden, z.B. unter Verwendung geeigneter Regulationselemente. Damit fällt die Suche nach Klonen in einer Gen-Bibliothek weg. Entsprechend können ORFs aus Sequenzierarbeiten (z.B. Humangenomprojekt) direkt in entsprechende Vektoren programmiert

- 18 -

und mit gewünschten genetischen Elementen kombiniert werden. Eine Identifikation von Klonen z.B. in durch aufwendiges Screening von cDNA-Bibliotheken entfällt. Damit ist der Informationsfluß von der Sequenz-Analyse zur Funktions-Analyse stark verkürzt worden, denn am 5 selben Tag, an dem ein ORF durch Analyse von Primärdaten im Computer vorliegt, kann ein entsprechender Vektor inklusive des vermuteten Gens synthetisiert und zur Verfügung gestellt werden.

Gegenüber konventioneller Festphasen-Synthese zur Gewinnung 10 synthetischer DNA zeichnet sich das Verfahren gemäß Erfindung durch geringeren Materialaufwand aus. Zur Herstellung tausender von unterschiedlichen Bausteinen für die Erzeugung von einem komplexen integrierten genetischen Element mit mehreren 100.000 kbp Länge, in entsprechend parallelisiertem Format und bei entsprechender 15 Miniaturisierung (siehe Ausführungsbeispiele), braucht ein mikrofluidisches System deutlich weniger Einsatzstoffe als ein konventioneller Festphasensynthese-Automat für ein einzelnes DNA-Oligomer (bei Verwendung einer einzigen Säule). Hier stehen Mikroliter dem Verbrauch von Millilitern gegenüber, d.h. ein Faktor von 1.000.

20 Unter Berücksichtigung neuester Erkenntnisse der Immunologie erlaubt das vorgestellte Verfahren ein extrem rationelles und schnelles Impfstoff-Design (DNA-Vakzine).

25 Ausführungsbeispiele

Die vorliegende Erfindung setzt zur Umsetzung des Verfahrens die Bereitstellung einer großen Anzahl von Nukleinsäure-Molekülen, meist DNA, voraus, die in ihrer Sequenz frei bestimbar sind. Diese Bausteine müssen innerhalb einer Baustein-Spezies nahezu 100 % identische Sequenz haben 30 (analog der Syntheseleistung konventioneller Syntheseautomaten). Zur Erzeugung der notwendigen Varianz kommen nur hochparallele Syntheseverfahren in Frage. Damit das System flexibel arbeiten kann und

- 19 -

dabei trotz der notwendigen Vielzahl von unterschiedlichen zu synthetisierenden Bausteinen möglichst wenig Raum und Reagenzien benötigt, erfolgt die Realisierung vorzugsweise in einem mikrofluidischen System, innerhalb dessen die einzelnen Sequenzen bestimmbar entstehen.

5 Für solche Systeme bieten sich zwei Arten der programmierten Synthese an, wie sie auch in den Patentanmeldungen DE 199 24 327.1, DE 199 40 749.5, PCT/EP99/06316 und PCT/EP99/06317 beschrieben sind: Dies ist einmal die Synthese durch programmierbare fluidische Individualisierung der Reaktionsbereiche und zum anderen die Synthese durch programmierbare 10 lichtabhängige Individualisierung der Reaktionsbereiche.

Bei beiden Varianten wird die Synthese in einem mikrofluidischen Reaktionsträger durchgeführt. Das Design dieses Reaktionsträgers kann dabei im System die stufenweise Zusammenführung der abgelösten 15 Syntheseprodukte, d.h. Bausteine, vorsehen, indem nach dem Ablösen der Nukleinsäurestränge diese in entsprechenden Reaktionsbereichen gesammelt werden und dort die Zusammenlagerung stattfindet. Gruppen solcher Zusammenlagerungs-Bereiche können dann ihrerseits wieder miteinander in Kontakt gebracht werden, so daß im Laufe einer mehr oder weniger langen 20 Kaskade die finalen Produkte der Synthese entstehen: Gentechnische Informationsträger in Form von DNA-Molekülen. Die folgenden Varianten kommen dabei in Frage:

Entweder erfolgen Synthese, Ablösung und Zusammenlagerung zeitlich nacheinander, aber räumlich integriert in einem mikrofluidischen 25 Reaktionsträger, oder aber Synthese, Ablösung und Zusammenlagerung erfolgen teilweise parallel in einem oder mehreren mikrofluidischen Reaktionsträgern. Weiterhin ist es möglich, daß der mikrofluidische Reaktionsträger nur Reaktionsbereiche für die programmierte Synthese enthält und anschließend die Ablösung und Elution in ein Reaktionsgefäß 30 für die Zusammenlagerung erfolgt.

- 20 -

Synthese, Ablösung und Zusammenlagerung können bei sehr großen DNA-Molekülen durch Kondensations-Strategien ergänzt werden, die ein Zerbrechen der Moleküle verhindern. Dazu zählt z.B. die Verwendung von Histonen (Kernproteine, die bei Eukaryoten die Kondensation der Chromosomen im Zellkern ermöglichen), der Einsatz von Topoisomerasen (Enzyme für die Verdrillung von DNA in Eukaryoten und Prokaryoten) oder die Zugabe von anderen DNA-bindenden, stabilisierenden und kondensierenden Agenzien bzw. Proteinen. Dies kann je nach Design des Reaktionsträgers durch Integration der Kondensationsreaktion in einer weiteren dafür vorgesehenen Reaktionskammer geschehen oder durch Zugabe während der stufenweisen Kombination und Zusammenlagerung der Bausteine.

Die freie Wahl der Sequenz ist von wesentlicher Bedeutung für die kontrollierte und effiziente stufenweise Zusammenlagerung der Bausteine bis zum Endprodukt. Denn durch die Wahl der überlappenden komplementären Enden werden die Spezifität der Zusammenlagerung und die biochemischen Rahmenbedingungen (Salzkonzentration, Temperatur etc.) beeinflußt. Bei Vorgabe einer Sequenz für das interessierende Gen und nach automatischer oder manueller Auswahl der anderen genetischen Elemente (Regulationsbereiche, Resistenzgene zum Klonieren, Propagationssignale etc.) zur Bestimmung des finalen Produktes (z.B. ein Plasmid-Vektor) zerlegt man die vorgegebene Sequenz in geeignete Bausteine und synthetisiert diese in der notwendigen Zahl von Reaktionsträgern. Die Fragmente bzw. deren zu hybridisierende Überlappungsbereiche werden so gewählt, daß die Bedingungen für das Hybridisieren möglichst ähnlich sind (u.a. GC : AT Verhältnis, Schmelzpunkte, etc.).

Bei weiterem Ausbau des Systems sind ebenfalls in Mikrofluidik bzw. Mikrosystemtechnik ausgeführte Elemente für die Reinigung und Isolation des entstehenden Produktes vorgesehen. Dies können z.B. Verfahren sein,

- 21 -

bei denen die finale doppelsträngige DNA nach ihrem Aufbau unter Verwendung von fluoreszierenden Synthonen eine bestimmte Gesamtfluoreszenz aufweisen muß. Gegebenenfalls kann bei Einsatz von kondensierend wirkenden Proteinen auch an diesen eine Fluoreszenzmarkierung hängen, die vorzugsweise getrennt detektierbar ist (Referenzsignal). In den Reaktionsträger-Strukturen kann dann das Gemisch an finalem Reaktionsprodukt nach Fluoreszenz sortiert werden (siehe Chou et al., Proceedings of the National Academy of Science PNAS 96:11-13, 1999). Somit wird eine ausreichende Qualität erreicht, um für die weiteren Arbeiten direkt ein Produkt zur Verfügung zu stellen.

Informationen aus Sequenzierprojekten, die in Datenbanken vorliegen, können (computergestützt) vollautomatisch auf Gene hin untersucht werden. Identifizierte oder vermutete Gene (ORFs) werden in vollsynthetische DNA umgewandelt, die gegebenenfalls geeignet erscheinende regulatorische und sonstige genetische Elemente enthalten kann, so daß z.B. ein oder mehrere Vektoren erzeugt werden. Das Produkt wird entweder zur Verfügung gestellt (z.B. als reine DNA) oder direkt in funktionelle Untersuchungen eingespeist, u.a. durch Transfer in geeignete Zielzellen. Die Information kann aus öffentlichen Datenbanken, aus Arbeiten dezentraler Anwender oder aus sonstigen Quellen, z.B. dem in den Patentanmeldungen DE 199 24 327.1 und DE 199 40 749.5 beschriebenen Verfahren stammen.

Es kann von Interesse sein, daß an bestimmter Stelle oder Stellen der Zielsequenz eine Varianz an randomisierter Sequenz vorkommt. Ein Beispiel ist das Austesten von Varianten einer Bindestelle, bei der z.B. über einen Bereich von 20 Aminosäuren, d.h. 60 Nukleotiden, zufällige Variationen an Nukleotiden eingebaut wurden. Dies kann in einer Ausführungsform geschehen, indem während des Syntheseprozesses nach Aktivierung eines Reaktionsbereiches ein Gemisch an Synthonen zugeführt wird, so daß sich alle zugegebenen Synthone statistisch verteilt anlagern können. Eine

- 22 -

Abwandlung dieses Prozesses kann vorsehen, daß an einer bestimmten Position der Zielsequenz unterschiedlich lange DNA-Bausteine eingesetzt werden, z.B. indem unterschiedliche Bausteine auf unterschiedlichen Reaktionsbereichen hergestellt werden, die die gleiche Sequenz zur 5 Überlappung und Hybridisierung zeigen.

Fig. 1 zeigt einen Reaktionsträger 30 im senkrechten Schnitt orthogonal zu den darauf befindlichen Mikrokanälen 33, die durch Wände 32 voneinander getrennt sind. Die Unterseite 31 des Reaktionsträgers ist 10 dabei lichtdurchlässig. Weiterhin schematisch dargestellt ist eine einzelsträngige Nukleinsäure 10 mit der konventionsgerechten Bezeichnung des 5'- und des 3'-Endes. Diese sind dargestellt als 10a mit dem 3'-Ende am Reaktionsträger 30 kovalent angebunden durch Festphasensynthese. Ebenfalls dargestellt ist eine Lichtquellenmatrix 20 mit einer Lichtquelle und 15 dem Reaktionsträger 30 zugewandten steuerbaren Belichtungsaustritt.

Fig. 2 zeigt einen Reaktionsträger 30 in Draufsicht mit Reaktionsbereichen 12 und den Wänden 32 zwischen den Mikrokanälen 33. Die Pfeile veranschaulichen die Durchflußrichtung.
20

Fig. 3 zeigt ähnlich wie Fig. 1 einen senkrechten Schnitt durch den Reaktionsträger 30, wobei im Mikrokanal 33 die einzelsträngigen Nukleinsäuren abgelöst sind.

25 In Fig. 4 ist wiederum der Reaktionsträger 30 in Draufsicht dargestellt, wobei im Mikrokanal 33 die einzelsträngigen Nukleinsäuren abgelöst sind.

30 Fig. 5 zeigt die Anordnung der Mikrokanäle in Aufsicht mit fluidischen Reaktionsräumen 50, die die einzelnen Reaktionsbereiche enthalten, und Reaktionskammern, wo die Zusammenlegung einer Teilsequenz erfolgt. Im Reaktionsraum 54 werden alle Mikrokanäle innerhalb eines Reaktionsträgers

- 23 -

zusammengeführt. Dort findet auch die Zusammenlagerung des finalen Syntheseprodukts statt, welches durch den Ausgang 55 entnommen wird. Die Bezugszeichen 51a und 51b kennzeichnen die in Fig.6 und Fig.7 bzw. Fig.8 dargestellten vergrößerten Darstellungen einer Reaktionskammer. Die 5 Pfeile signalisieren wiederum die Flußrichtung.

Fig. 6 zeigt eine vergrößerte Darstellung einer Reaktionskammer 51a nach einem Mikrokanal mit abgelösten einzelsträngigen Nukleinsäuren.

10 Fig. 7 zeigt eine vergrößerte Darstellung einer Reaktionskammer 51a nach einem Mikrokanal mit einem doppelsträngigen Hybrid 60 aus zwei aneinandergelagerten komplementären Nukleinsäureeinzelsträngen.

15 Fig. 8 zeigt eine vergrößerte Darstellung einer Reaktionskammer 51b nach Zusammenführung von zwei Mikrokanälen mit einem zusammengelagerten doppelsträngigen Nukleinsäure-Hybrid 62, Enzyme 63 (z.B. Ligasen) für die kovalente Verknüpfung der Bausteine des Nukleinsäure-Hybrids 85, einem linearen kovalent verknüpften Nukleinsäuredoppelstrang 65 und einem ringförmig geschlossenen 20 Nukleinsäuredoppelstrang 66 (z.B. Vektor).

Als Bezugszeichen 64 ist eine Reaktion der Enzyme mit dem Nukleinsäure-Hybrid dargestellt.

25

Patentansprüche

1. Verfahren zur Synthese von Polymeren,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine Vielzahl von Oligomerbaublöcken auf einem Träger durch
parallele Syntheseschritte aufgebaut, vom Träger abgelöst und
untereinander zum Aufbau des Polymeren in Kontakt gebracht
werden.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß doppelsträngige Nukleinsäure-Polymeren mit einer Länge von
mindestens 300 bp, insbesondere mindestens 1000 bp synthetisiert
werden.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß Nukleinsäure-Polymeren ausgewählt aus Genen, Genclustern,
Chromosomen, viralen und bakteriellen Genomen oder Abschnitten
davon synthetisiert werden.
- 20 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Oligomerbaublöcke eine Länge von 5 bis 150, vorzugsweise
5 bis 30 Monomereinheiten aufweisen.
- 25 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß in aufeinanderfolgenden Schritten jeweils partiell komplementäre
Oligonukleotidbaublöcke vom Träger abgelöst und unter Hybridis-

- 25 -

sierungsbedingungen miteinander bzw. mit dem Polymer-Zwischenprodukt in Kontakt gebracht werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung synthetischer Nukleinsäuredoppelstränge wahlfreier Sequenz, umfassend die Schritte:
 - (a) Bereitstellen eines Trägers mit einer Oberfläche, die eine Vielzahl von individuellen Reaktionsbereichen enthält,
 - (b) ortsaufgelöstes Synthetisieren von Nukleinsäurefragmenten mit jeweils unterschiedlicher Basensequenz an mehreren der individuellen Reaktionsbereiche, und
 - (c) Ablösen der Nukleinsäurefragmente von individuellen Reaktionsbereichen.
- 15 7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Basensequenzen der an individuellen Reaktionsbereichen synthetisierten Nukleinsäurefragmente so gewählt werden, daß sie sich zu einem Nukleinsäuredoppelstrang-Hybrid zusammenlagern
- 20 8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Ablösen der Nukleinsäurefragmente gemäß Schritt (c) in einem oder mehreren Schritten unter solchen Bedingungen erfolgt, daß sich mehrere der abgelösten Nukleinsäurefragmente zu einem Nukleinsäuredoppelstrang-Hybrid zusammenlagern.
- 25 9. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,

- 26 -

daß mehrere Nukleinsäurefragmente, die einen Strang des Nukleinsäuredoppelstrang-Hybrids bilden, kovalent miteinander verbunden werden.

- 5 10. Verfahren nach Anspruch 9,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß das kovalente Verbinden eine Behandlung mit Ligase oder/und ein Auffüllen von Lücken in den Strängen mit DNA-Polymerase umfaßt.
- 10 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 10,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß in der Sequenz an einer oder mehreren Positionen Erkennungssequenzen für die spezifische Interaktion mit Molekülen wie Proteinen, Nukleinsäuren, Peptiden, Pharmaka, Sacchariden, Lipiden, Hormonen oder/und organischen Verbindungen enthalten sind.
- 15 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 11,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die Sequenz der Nukleinsäuredoppelstränge eine natürlich vorkommende Sequenz, eine nicht natürlich vorkommende Sequenz oder eine Kombination aus diesen beiden ist.
- 20 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 12,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die Sequenz aus einer Datenbank, einem Sequenziertest oder einer Vorrichtung zur integrierten Synthese und Analyse von Polymeren entnommen ist.
- 25 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
 dadurch gekennzeichnet,

- 27 -

daß die Oligomerbaublöcke durch orts- oder/und zeitaufgelöste Belichtung mittels einer programmierbaren Lichtquellenmatrix synthetisiert werden.

- 5 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine orts- oder/und zeitaufgelöste Synthese der
Oligomerbaublöcke in einem mikrofluidischen Reaktionsträger mit
einem oder mehreren fluidischen Reaktionsräumen und einem oder
10 mehreren Reaktionsbereichen innerhalb eines fluidischen
Reaktionsraumes erfolgt.
- 15 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Synthesebausteine in der Natur vorkommende Nukleotide,
modifizierte Nukleotide oder Mischungen davon enthalten.
- 20 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß modifizierte Synthesebausteine zur Markierung und späteren
Detektion der zusammengelagerten Nukleinsäuredoppelstränge
verwendet werden.
- 25 18. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Markierungsgruppen lichtabhängig zu detektierende Moleküle
verwendet werden.
- 30 19. Verwendung eines nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche
1 bis 18 hergestellten Nukleinsäuredoppelstranges wahlfreier
Sequenz für therapeutische oder pharmakologische Zwecke.

- 28 -

20. Verwendung eines nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18 hergestellten Nukleinsäuredoppelstranges wahlfreier Sequenz für diagnostische Zwecke.
- 5 21. Verwendung nach Anspruch 19 oder 20, umfassend die direkte Zuführung zum beabsichtigten Zweck.
- 10 22. Verwendung nach Anspruch 19 oder 20, umfassend eine Umsetzung in Effektorzellen.
- 15 23. Verwendung eines nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18 hergestellten Nukleinsäuredoppelstranges wahlfreier Sequenz, wobei dieser während der stufenweisen Kombination und Zusammenlagerung oder im Anschluß daran stabilisiert, kondensiert oder/und topologisch manipuliert wird.
- 20 24. Verwendung nach Anspruch 23, wobei die Stabilisierung, Kondensation oder/und topologische Manipulierung durch funktionelle Moleküle wie Histone oder Topoisomerasen erfolgt.
- 25 25. Verwendung eines nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18 hergestellten Nukleinsäuredoppelstranges als propagierbarer Klonierungs-Vektor, wobei der propagierbare Klonierungs-Vektor in geeigneten Zielzellen der Transkription, der Expression der transkribierten Sequenz, und gegebenenfalls der Gewinnung von exprimierten Genprodukten dienen kann.

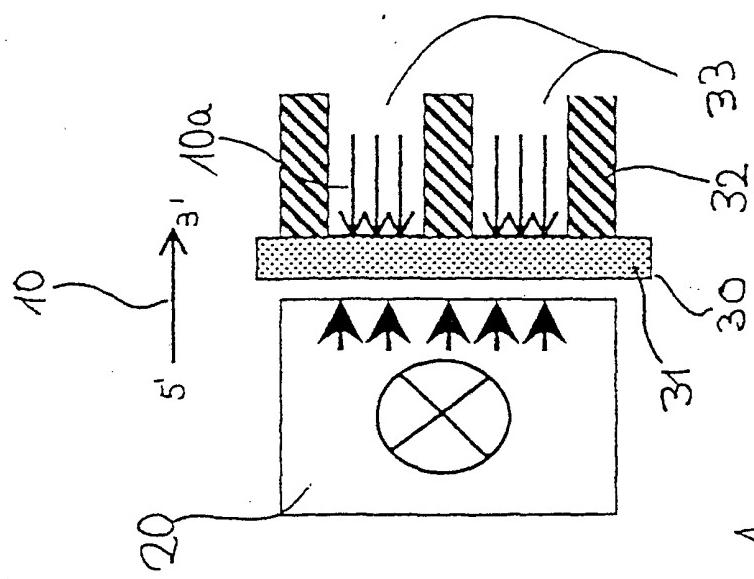
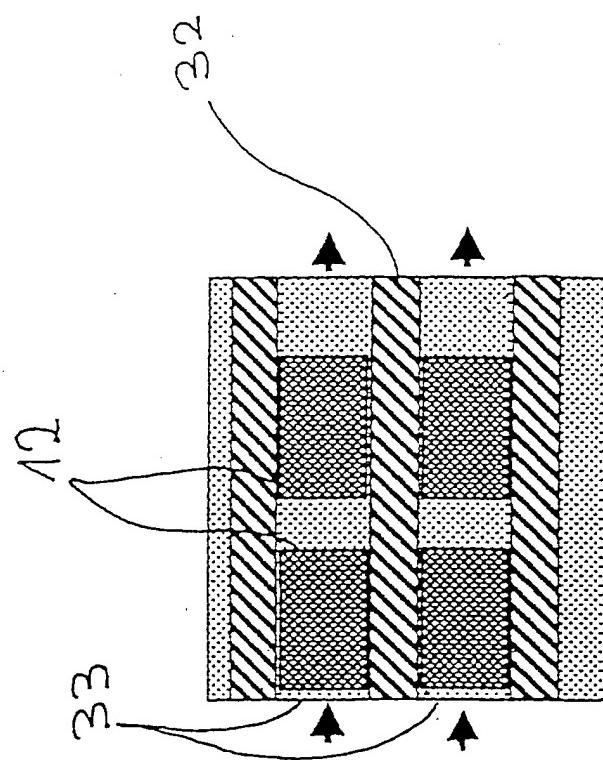


Fig. 1

2/7



3/7

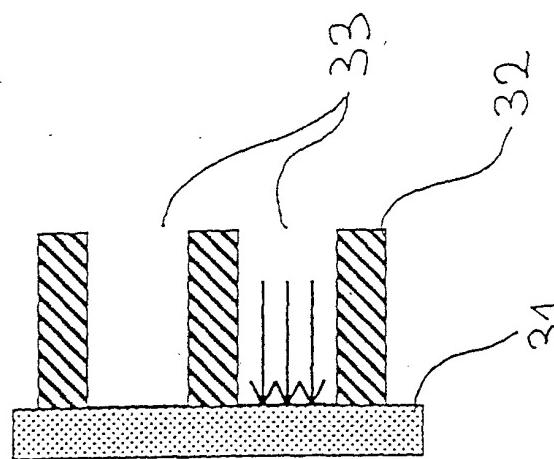


Fig. 3

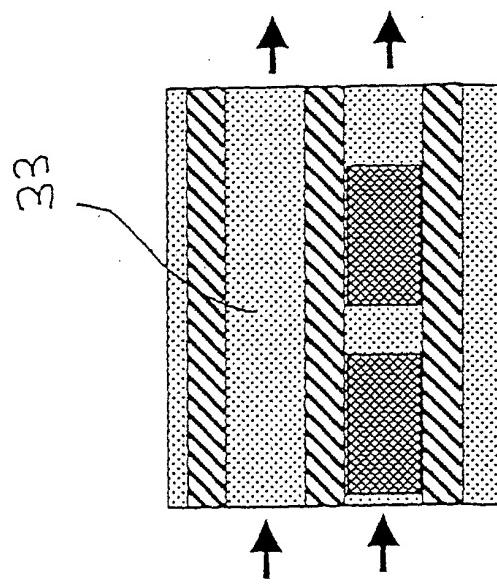
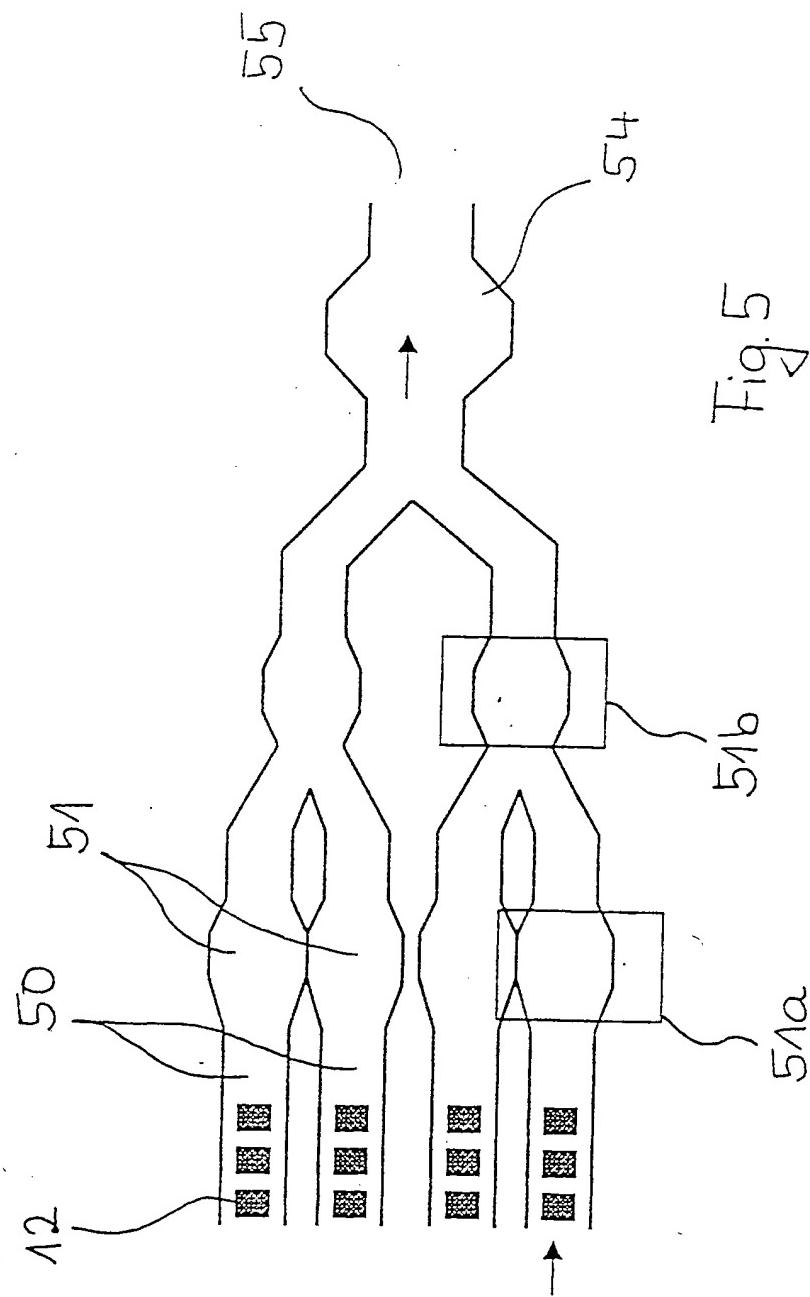


Fig. 4



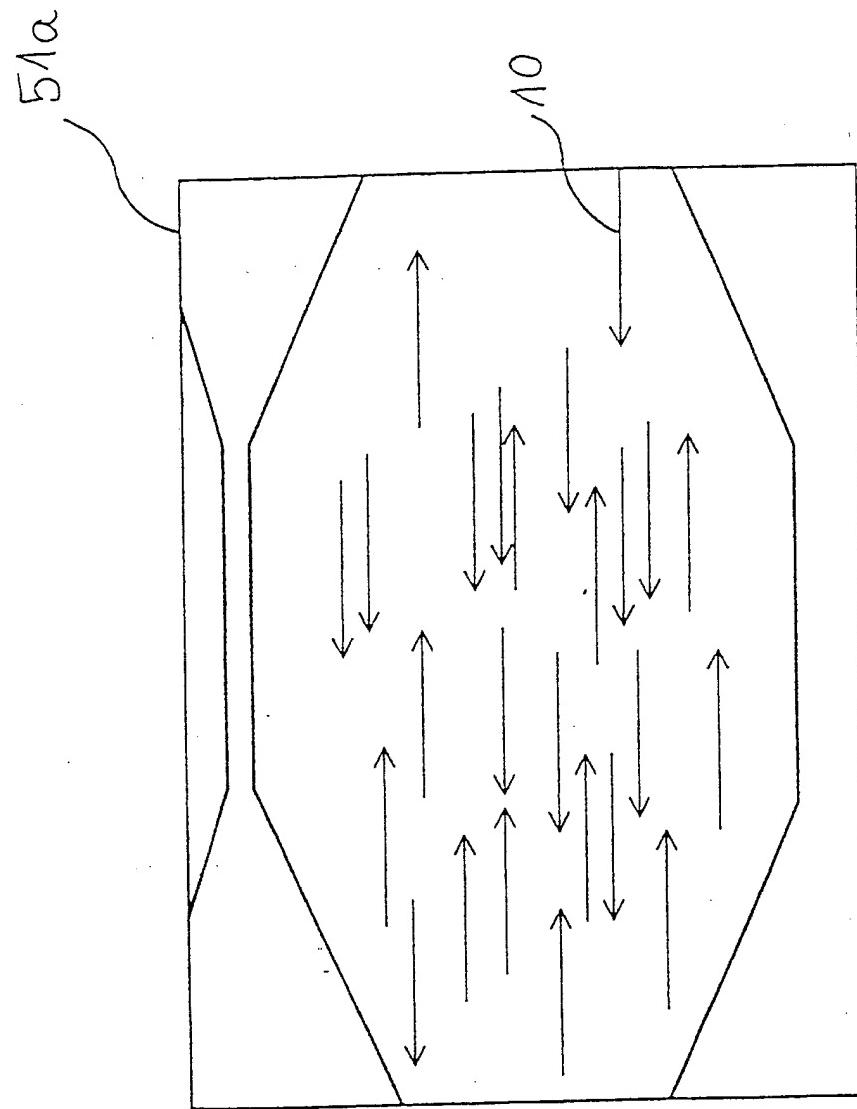


Fig. 6

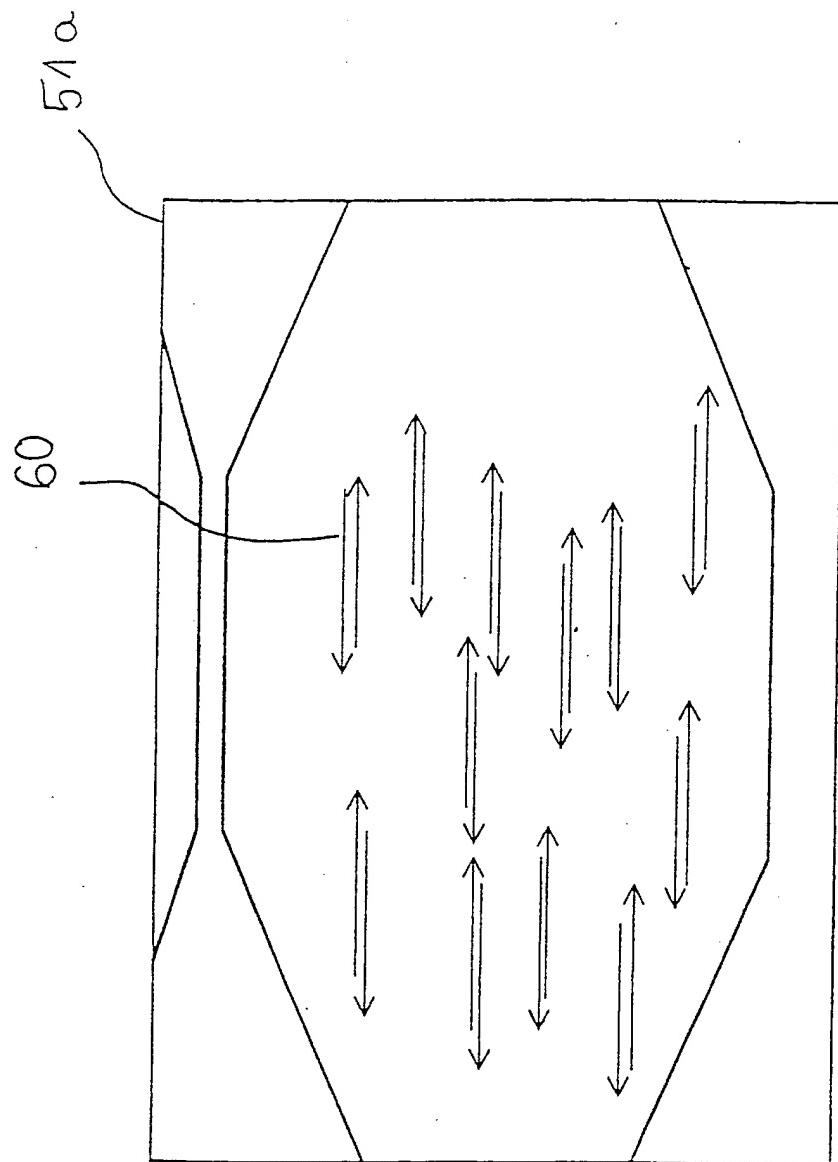


Fig. 7

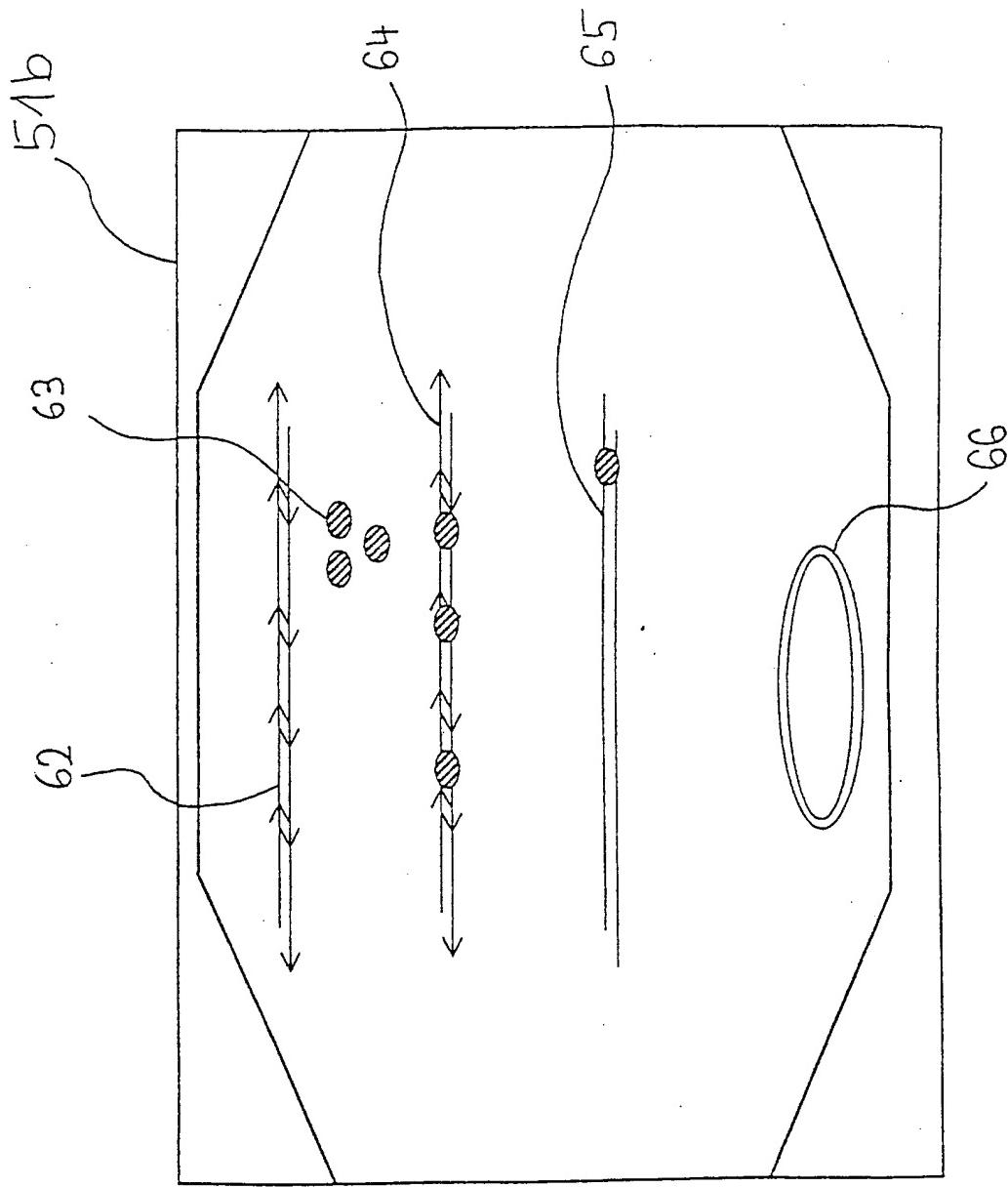


Fig. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/01356

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/10 C12P19/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, CAB Data, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E,L	WO 00 13017 A (FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY ;LINDNER HANS (DE); MUELLER MANFRED) 9 March 2000 (2000-03-09) claims 31-35 ---	1-5,14
A	S RAYNER ET AL: "MerMade: An oligodeoxyribonucleotide synthesizer for high throughput oligonucleotide production in dual 96-well plates" PCR METHODS AND APPLICATIONS, US, COLD SPRING HARBOR, NY, vol. 8, no. 7, 1 July 1998 (1998-07-01), pages 741-747, XP002089330 ISSN: 1054-9803 the whole document ---	-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 June 2000	06/07/2000
Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int	lational Application No
PCT/EP 00/01356	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90 00626 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE) 25 January 1990 (1990-01-25) the whole document ---	
A	EP 0 385 410 A (CANON KK) 5 September 1990 (1990-09-05) the whole document ---	
A	WO 94 12632 A (UNIV LONDON ;PRODROMOU CHRISOSTOMOS (GB); PEARL LAURENCE HARRIS (G) 9 June 1994 (1994-06-09) the whole document ---	
A	WO 95 17413 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH ;SCHWIENHORST ANDREAS (DE); LINDEMANN BJOER) 29 June 1995 (1995-06-29) the whole document ---	
A	EP 0 316 018 A (CETUS CORP) 17 May 1989 (1989-05-17) the whole document ---	
A	EP 0 130 166 A (KABIGEN AB) 2 January 1985 (1985-01-02) the whole document ---	
A	EP 0 022 242 A (GENENTECH INC) 14 January 1981 (1981-01-14) the whole document ---	
A	L E SINDELAR AND J M JAKLEVIC: "High-throughput DNA synthesis in a multichannel format" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 23, no. 6, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 982-987, XP002089329 ISSN: 0305-1048 the whole document ---	
A	LASHKARI D A ET AL: "AN AUTOMATED MULTIPLEX OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIZER: DEVELOPMENT OF HIGH-THROUGHPUT, LOW-COST DNA SYNTHESIS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, vol. 92, no. 17, 15 August 1995 (1995-08-15), pages 7912-7915, XP000611248 ISSN: 0027-8424 the whole document ---	
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int	lational Application No
PCT/EP 00/01356	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WO 99 14318 A (EVANS GLEN A ;UNIV TEXAS (US)) 25 March 1999 (1999-03-25) the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members				International Application No PCT/EP 00/01356	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
WO 0013017 A	09-03-2000	AU 5625399 A AU 5742499 A AU 5971399 A DE 19940749 A DE 19940750 A DE 19940751 A DE 19940752 A DE 19940810 A WO 0012123 A WO 0013018 A		21-03-2000 21-03-2000 21-03-2000 18-05-2000 21-06-2000 02-03-2000 27-04-2000 11-05-2000 09-03-2000 09-03-2000	
WO 9000626 A	25-01-1990	AU 3869289 A EP 0427745 A JP 3505966 T		05-02-1990 22-05-1991 26-12-1991	
EP 0385410 A	05-09-1990	JP 3210195 A JP 3232489 A JP 3232490 A JP 3127999 A JP 3007583 A AT 143696 T DE 69028725 D DE 69028725 T US 5830643 A		13-09-1991 16-10-1991 16-10-1991 31-05-1991 14-01-1991 15-10-1996 07-11-1996 13-03-1997 03-11-1998	
WO 9412632 A	09-06-1994	NONE			
WO 9517413 A	29-06-1995	DE 4343591 A		22-06-1995	
EP 0316018 A	17-05-1989	EP 0196762 A EP 0314202 A JP 2579619 B JP 61293916 A JP 2574142 B JP 8048700 A US 5079163 A US 5538868 A US 5858734 A		08-10-1986 03-05-1989 05-02-1997 24-12-1986 22-01-1997 20-02-1996 07-01-1992 23-07-1996 12-01-1999	
EP 0130166 A	02-01-1985	GB 2142033 A IT 1175508 B JP 60019493 A		09-01-1985 01-07-1987 31-01-1985	
EP 0022242 A	14-01-1981	US 4342832 A AT 82324 T AU 533697 B AU 5949880 A BE 884012 A BG 41135 A BR 8008736 A CA 1164375 A CA 1202256 C CH 661939 A CS 8402708 A CS 250655 B CS 250652 B DD 157343 A DD 210070 A		03-08-1982 15-11-1992 08-12-1983 15-01-1981 29-12-1980 15-04-1987 28-04-1981 27-03-1984 25-03-1986 31-08-1987 16-07-1987 14-05-1987 14-05-1987 03-11-1982 30-05-1984	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/01356

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0022242 A		DD 210071 A	30-05-1984
		DE 3023627 A	22-01-1981
		DE 3050722 C	24-09-1987
		DE 3050725 C	10-03-1988
		DK 97381 A	04-03-1981
		DK 251490 A	18-10-1990
		EG 14819 A	31-03-1985
		ES 493149 D	16-05-1981
		ES 8105386 A	16-08-1981
		ES 499043 D	01-06-1982
		ES 8205265 A	16-09-1982
		FI 802030 A	06-01-1981
		FI 850198 A	16-01-1985
		FR 2460330 A	23-01-1981
		FR 2518572 A	24-06-1983
		GB 2055382 A,B	04-03-1981
		GB 2121047 A,B	14-12-1983
		GB 2121050 A,B	14-12-1983
		GR 69320 A	14-05-1982
		HK 87384 A	16-11-1984
		HK 87484 A	16-11-1984
		HK 87584 A	16-11-1984
		IE 50460 B	30-04-1986
		IE 50461 B	30-04-1986
		IE 50462 B	30-04-1986
		IL 60312 A	30-04-1985
		IL 69492 A	30-04-1985
		IT 1131393 B	18-06-1986
		JP 6012996 B	23-02-1994
		JP 56021596 A	28-02-1981
		JP 2000478 A	05-01-1990
		JP 6048987 B	29-06-1994
		JP 2622479 B	18-06-1997
		JP 5268970 A	19-10-1993
		JP 8242881 A	24-09-1996
WO 9914318 A	25-03-1999	AU 9393398 A	05-04-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/01356

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/10 C12P19/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, CAB Data, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
E,L	WO 00 13017 A (FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY ; LINDNER HANS (DE); MUELLER MANFRED) 9. März 2000 (2000-03-09) Ansprüche 31-35	1-5, 14
A	S RAYNER ET AL: "MerMade: An oligodeoxyribonucleotide synthesizer for high throughput oligonucleotide production in dual 96-well plates" PCR METHODS AND APPLICATIONS, US, COLD SPRING HARBOR, NY, Bd. 8, Nr. 7, 1. Juli 1998 (1998-07-01), Seiten 741-747, XP002089330 ISSN: 1054-9803 das ganze Dokument	-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Nutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

30. Juni 2000

06/07/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int.	tionales Aktenzeichen
PCT/EP 00/01356	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 90 00626 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE) 25. Januar 1990 (1990-01-25) das ganze Dokument ---	
A	EP 0 385 410 A (CANON KK) 5. September 1990 (1990-09-05) das ganze Dokument ---	
A	WO 94 12632 A (UNIV LONDON ;PRODROMOU CHRISOSTOMOS (GB); PEARL LAURENCE HARRIS (G) 9. Juni 1994 (1994-06-09) das ganze Dokument ---	
A	WO 95 17413 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH ;SCHWIENHORST ANDREAS (DE); LINDEMANN BJOER) 29. Juni 1995 (1995-06-29) das ganze Dokument ---	
A	EP 0 316 018 A (CETUS CORP) 17. Mai 1989 (1989-05-17) das ganze Dokument ---	
A	EP 0 130 166 A (KABIGEN AB) 2. Januar 1985 (1985-01-02) das ganze Dokument ---	
A	EP 0 022 242 A (GENENTECH INC) 14. Januar 1981 (1981-01-14) das ganze Dokument ---	
A	L E SINDELAR AND J M JAKLEVIC: "High-throughput DNA synthesis in a multichannel format" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 23, Nr. 6, 1. Januar 1995 (1995-01-01), Seiten 982-987, XP002089329 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument ---	
A	LASHKARI D A ET AL: "AN AUTOMATED MULTIPLEX OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIZER: DEVELOPMENT OF HIGH-THROUGHPUT, LOW-COST DNA SYNTHESIS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, Bd. 92, Nr. 17, 15. August 1995 (1995-08-15), Seiten 7912-7915, XP000611248 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument ---	
	-/--	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01356

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	WO 99 14318 A (EVANS GLEN A ;UNIV TEXAS (US)) 25. März 1999 (1999-03-25) das ganze Dokument -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/01356

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0013017 A	09-03-2000	AU 5625399 A AU 5742499 A AU 5971399 A DE 19940749 A DE 19940750 A DE 19940751 A DE 19940752 A DE 19940810 A WO 0012123 A WO 0013018 A		21-03-2000 21-03-2000 21-03-2000 18-05-2000 21-06-2000 02-03-2000 27-04-2000 11-05-2000 09-03-2000 09-03-2000
WO 9000626 A	25-01-1990	AU 3869289 A EP 0427745 A JP 3505966 T		05-02-1990 22-05-1991 26-12-1991
EP 0385410 A	05-09-1990	JP 3210195 A JP 3232489 A JP 3232490 A JP 3127999 A JP 3007583 A AT 143696 T DE 69028725 D DE 69028725 T US 5830643 A		13-09-1991 16-10-1991 16-10-1991 31-05-1991 14-01-1991 15-10-1996 07-11-1996 13-03-1997 03-11-1998
WO 9412632 A	09-06-1994	KEINE		
WO 9517413 A	29-06-1995	DE 4343591 A		22-06-1995
EP 0316018 A	17-05-1989	EP 0196762 A EP 0314202 A JP 2579619 B JP 61293916 A JP 2574142 B JP 8048700 A US 5079163 A US 5538868 A US 5858734 A		08-10-1986 03-05-1989 05-02-1997 24-12-1986 22-01-1997 20-02-1996 07-01-1992 23-07-1996 12-01-1999
EP 0130166 A	02-01-1985	GB 2142033 A IT 1175508 B JP 60019493 A		09-01-1985 01-07-1987 31-01-1985
EP 0022242 A	14-01-1981	US 4342832 A AT 82324 T AU 533697 B AU 5949880 A BE 884012 A BG 41135 A BR 8008736 A CA 1164375 A CA 1202256 C CH 661939 A CS 8402708 A CS 250655 B CS 250652 B DD 157343 A DD 210070 A		03-08-1982 15-11-1992 08-12-1983 15-01-1981 29-12-1980 15-04-1987 28-04-1981 27-03-1984 25-03-1986 31-08-1987 16-07-1987 14-05-1987 14-05-1987 03-11-1982 30-05-1984

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01356

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0022242 A		DD 210071 A	30-05-1984
		DE 3023627 A	22-01-1981
		DE 3050722 C	24-09-1987
		DE 3050725 C	10-03-1988
		DK 97381 A	04-03-1981
		DK 251490 A	18-10-1990
		EG 14819 A	31-03-1985
		ES 493149 D	16-05-1981
		ES 8105386 A	16-08-1981
		ES 499043 D	01-06-1982
		ES 8205265 A	16-09-1982
		FI 802030 A	06-01-1981
		FI 850198 A	16-01-1985
		FR 2460330 A	23-01-1981
		FR 2518572 A	24-06-1983
		GB 2055382 A, B	04-03-1981
		GB 2121047 A, B	14-12-1983
		GB 2121050 A, B	14-12-1983
		GR 69320 A	14-05-1982
		HK 87384 A	16-11-1984
		HK 87484 A	16-11-1984
		HK 87584 A	16-11-1984
		IE 50460 B	30-04-1986
		IE 50461 B	30-04-1986
		IE 50462 B	30-04-1986
		IL 60312 A	30-04-1985
		IL 69492 A	30-04-1985
		IT 1131393 B	18-06-1986
		JP 6012996 B	23-02-1994
		JP 56021596 A	28-02-1981
		JP 2000478 A	05-01-1990
		JP 6048987 B	29-06-1994
		JP 2622470 B	18-06-1997
		JP 526897 A	19-10-1993
		JP 8242881 A	24-09-1996
WO 9914318 A	25-03-1999	AU 9393398 A	05-04-1999.

